

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21361

研究課題名(和文)線虫におけるD-セリンの新奇な生理機能

研究課題名(英文)Studies on novel physiological functions of D-serine in nematode *C. elegans*

研究代表者

齋藤 康昭(Saitoh, Yasuaki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00631730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含めた哺乳類の中枢神経系には高濃度の D-セリンが存在する。D-セリンは NMDA 受容体を介して高次の脳機能に重要な働きをしていることが示唆されている。申請者は、モデル生物である線虫 *C. elegans* の耐性幼虫では、正常発生した幼虫と比較して D-セリン含量が著しく増加し、D-セリンが耐性幼虫の成長に関与していることを明らかにした。また、哺乳類セリンラセマーゼと相同性が高い遺伝子の一つは、L-セリンデヒドラターゼをコードしていること、また、D-セリン合成に間接的に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：D-Serine is an endogenous co-agonist for NMDA receptors and regulates neurotransmission and synaptic plasticity in the central nervous system. We have shown that D-serine is present in high concentration in dauer larva of nematode *Caenorhabditis elegans*, a multicellular model animal, and that D-serine is involved in several aspects of dauer development. We also found that one of mammalian serine racemase homologous genes is L-serine dehydratase and is involved indirectly in D-serine synthesis.

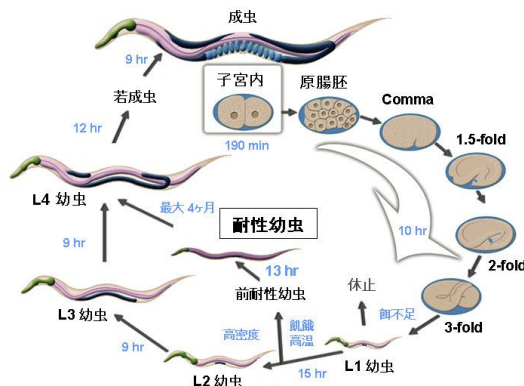
研究分野：分子生物学、分析化学

キーワード：D-セリン 線虫 耐性幼虫 L-セリンデヒドラターゼ

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた哺乳類の中樞神経系には高濃度の D-セリンが存在する。D-セリンは NMDA 受容体のコアゴニストとして、グルタミン酸による神経伝達に重要な働きをしていることが明らかになってきた。さらに、D-セリンと NMDA 型グルタミン酸受容体シグナル伝達系の異常が統合失調症や筋萎縮性側索硬化症など重篤な病態の発現をもたらすことも多くの研究グループにより報告されている。さらに、D-セリンは 82 型グルタミン酸受容体に結合してシナプス可塑性や運動学習を制御することが報告されている。一方、D-セリンの合成酵素としては、D-セリンと L-セリンの相互変換を触媒するセリンラセマーゼが知られている。また、D-セリンなどの中性・塩基性 D-アミノ酸を立体特異的に分解する酵素として D-アミノ酸オキシダーゼが知られている。哺乳類におけるこれらの酵素は、D-セリンの体内濃度を調節していると考えられているが、その機能に関する詳細は明らかになっていない。

申請者は、その分子論的解析を行うため、遺伝学的・分子生物学的解析がしやすいモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究を行っている。線虫は、飢餓状態などの環境の悪化に対応して、脂肪を体内に蓄積しエネルギーを節約しながら長期間餓死で生存できる耐性幼虫という状態に変化する(図1)。正常発生した線虫の寿命は約2週間であるが、耐性幼虫は2~3ヶ月間も生存し、この間に老化は起こらない。その後外部環境が改善されると、耐性幼虫は正常発生に復帰する(図1)。たいへん興味深いことに、正常発生した幼虫では全セリン(L体+D体)含量の約5%がD-セリンであるのに対して、耐性幼虫では約20%にまで増加していることが明らかになった。すなわち、D-セリンが線虫の成長や寿命の調節に何らかの役割を果たしている可能性が示された。50年以上前から、カイコ(蚕)幼虫が蛹へ変態する際に、一過的にD-セリン含量が増加することが知られていたが、この問題は未解明のまま残されている。



Wormatlas (<http://www.wormatlas.org>)より一部改変

図1 線虫のライフサイクル

2. 研究の目的

本研究では、実験的解析が容易な線虫を用いて、これまで知られていなかったD-セリンの生理機能の詳細を明らかにするために、以下の基盤的解析を行った。

- (1) 耐性幼虫期の各段階の線虫および正常発生へ復帰した線虫では D-セリン含量がどのように変動するのかを解析した。
- (2) D-セリンを生合成するセリンラセマーゼの遺伝子を同定し、酵素学的性質、発現時期・組織分布を明らかにするとともに、欠損変異体の成長や老化に関連する表現型を明らかにすることとした。後述するように本研究のアプローチでは、セリンラセマーゼ遺伝子を同定することができなかった。
- (3) セリンラセマーゼ遺伝子を探索する過程で、推定セリンデヒドラターゼである K01C8.1 の欠損変異体の耐性幼虫では、D-セリン含量がさらに増加することを見出した。したがって、本遺伝子の機能の詳細を明らかにするための解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 耐性幼虫期の各ステージの線虫、正常発生へ復帰した線虫体内の D-セリン含量を以下のように定量する。耐性幼虫の調製には、高温下(25℃)で耐性幼虫に移行しやすいインスリン受容体をコードする *daf-2* 遺伝子の変異体を用いた。通常の培養条件下で同調培養した *daf-2* 変異体の L1 幼虫を餌のないプレートに移し、25℃で経時的に培養して得られる耐性幼虫をサンプルとした。また、耐性幼虫の一部を餌のあるプレートに移し、通常の培養温度で培養して正常発生に復帰した L4 幼虫をサンプルとした。得られたサンプルをスクロース遠心による分離後、超音波処理器を用いて破碎し、HPLC により D, L-セリンを定量した。また、耐性幼虫の形成を決定するインスリンシグナル伝達経路、TGF-βシグナル伝達経路およびステロイドホルモンシグナル伝達経路の内、TGF-βシグナル伝達経路およびステロイドホルモンシグナル経路の変異体である *daf-7* 変異体および *daf-9* 変異体の耐性幼虫でも D-セリン含量の増加が起こるかどうかを調べた。

(2) 哺乳類セリンラセマーゼのアミノ酸配列と相同性を持つ6種類の遺伝子を線虫セリンラセマーゼ候補遺伝子とした。セリンラセマーゼを欠損した線虫変異体の耐性幼虫では、D-セリン含量が低下していると予想される。これらの候補遺伝子の変異体の D-セリン含量を上記の方法を用いて解析した。

(3) C末に His タグが付加された K01C8.1 遺伝子産物を発現するプラスミドを構築し、大腸菌 Rosetta 株に導入した。コールドショックによる発現誘導後に可溶性画分を調製し、Ni カラムを用いて組換え体を精製した。精製した組換え体の D, L-Ser に対するデヒドラターゼ活性は、酵素反応により生成するピルビン酸を定量して測定した。

K01C8.1 遺伝子のプロモーター活性により、赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現する線虫形質転換体を作製し、得られた形質転換体の蛍光観察を行った。

daf-2 変異体および *daf-2;K01C8.1* 二重変異体における耐性幼虫の形成率および復帰率は、1% SDS 溶液の添加により生存する線虫を耐性幼虫と判定して測定した。

4. 研究成果

(1) 長期間培養した耐性幼虫体内の D-セリン含量は高レベルに維持された。また、耐性幼虫を通常の培養条件に移した線虫では、正常発生した線虫と同程度にまで D-セリン含量が低下した。また、耐性幼虫の形成を決定する複数のシグナル伝達経路の各変異体 (*daf-2*, *daf-7* および *daf-9*) の耐性幼虫いずれにおいても D-セリン含量の著しい増加が認められた。すなわち、D-セリンが耐性幼虫の形成や維持の調節に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

(2) 哺乳類セリンラセマーゼのアミノ酸配列と相同性を持つ 6 種類の遺伝子の欠損変異体の耐性幼虫のいずれにおいても D-セリン含量の低下は認められなかった。したがって、これらの遺伝子は、D-セリンの合成に関する主要な因子ではないことが考えられた。たいへん興味深いことに、推定セリンデヒドラターゼである K01C8.1 の欠損変異体では、正常発生した幼虫 (L3 幼虫) および耐性幼虫においてそれぞれ L-セリンおよび D, L-セリン含量が増加した。このことは、K01C8.1 は D, L-セリンの両方、またはいずれかに分解活性を持つことが示唆された。

(3) C 末端に His タグを付加させた K01C8.1 遺伝子産物を発現する大腸菌を樹立した後、可溶性画分を調製し、Ni カラムを用いて組換え体の精製を行った。精製した組換え体の種々のアミノ酸に対するデヒドラターゼ活性を測定した結果、L-セリンに対してデヒドラターゼ活性を持つことが明らかになった。また、K01C8.1 の L-セリンに対するデヒドラターゼ活性は、PLP を補酵素とし、30 の最適温度および pH 9.0 の最適 pH であった。また、K01C8.1 の L-セリンに対するデヒドラターゼ活性の動力学定数は、既に報告されているヒト L-セリンデヒドラターゼと同程度であった。一方、D, L-セリンに対するラセマーゼ活性は示さなかった。これらのことから、K01C8.1 は L-セリンデヒドラターゼあり、K01C8.1 欠損変異体の耐性幼虫では、L-セリンに対するデヒドラターゼの欠損の結果、L-セリン含量が増加し、セリンラセマーゼを介した D-セリン含量の増加が引き起こされたと考えられた。

K01C8.1 遺伝子のプロモーター活性により、mCherry を発現する線虫形質転換体の蛍光観察を行った結果、正常発生した幼虫および耐性幼虫のいずれの成長段階においても腸および下皮で発現することが明らかになった。

daf-2;K01C8.1 二重変異体の耐性幼虫形成率および正常発生への復帰率は、*daf-2* 変異体と同程度であった。したがって、K01C8.1 は、耐性幼虫の形成や正常発生への復帰を調節する主要な因子ではないことが考えられた。*daf-2;K01C8.1* 変異体の寿命の解析を試みたが、長期間の培養の間に耐性幼虫が培養プレートの壁に登るなどしたために解析を行うことができなかった。今後は、解析条件を検討し、耐性幼虫の維持や寿命における K01C8.1 の役割を検討したいと考えている。また、D-セリンが耐性幼虫の形成や正常発生への復帰にどのようなメカニズムで関与しているのかを明らかにするために、形成率および復帰率に対する D-セリンの添加の影響、および線虫個体における D-セリンの局在部位・時期を解析しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Katane M., Saitoh Y., Uchiyama K., Nakayama K., Saitoh Y., Miyamoto T., Sekine M., Uda K., Homma H. Characterization of a homolog of mammalian serine racemase from *Caenorhabditis elegans*: the enzyme is not critical for the metabolism of serine *in vivo*. *Genes to cells*. 査読有 (2016) 21: 966-977

[学会発表](計 19 件)

齋藤 康昭, 宮本 哲也, 関根 正恵, 片根 真澄, 本間 浩 「線虫における新規分泌型 D-アスパラギン酸オキシダーゼの機能解析」 第 37 回 白金シンポジウム (東京、北里大学白金キャンパス) 2016.12.20

齋藤 康昭, 片根 真澄, 宮本 哲也, 関根 正恵, 坂本 太郎, 今井 浩孝, 本間 浩 「分泌タンパク質として機能する線虫 D-アスパラギン酸オキシダーゼの解析」 第 39 回日本分子生物学会年会 (神奈川、パシフィコ横浜) 2016.12.1

齋藤 康昭, 片根 真澄, 宮本 哲也, 関根 正恵, 坂本 太郎, 今井 浩孝, 本間 浩 「線虫における新規分泌型 D-アミノ酸代謝酵素の機能解析」 第 12 回 D-アミノ酸学会 学術講演会 (高知、高知大学朝倉キャンパス) 2016.9.14

齋藤 康昭, 宮本 哲也, 関根 正恵, 片根 真澄, 本間 浩 「線虫における D-セリンの新奇な生理機能」 第 35 回 白金シンポジウム (東京、北里大学白金キャンパス) 2015.12.22

齋藤 康昭, 宮本 哲也, 関根 正恵, 片根 真澄, 坂本 太郎, 今井 浩孝, 新井 洋由,

本間 浩 「D-アミノ酸による線虫の寿命制御」 第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学会合同学会ワークショップ(兵庫、神戸ポートアイランド) 2015.12.3

中野 俊哉、齋藤 康昭、宮本 哲也、関根 正恵、片根 真澄、坂本 太郎、今井 浩孝、新井 洋由、本間 浩 「線虫におけるD-セリンの新奇な生理機能の解明」 第11回D-アミノ酸学会学術講演会(新潟、シティーホールプラザアオーレ長岡) 2015.8.26

齋藤 康昭、宮本 哲也、関根 正恵、片根 真澄、坂本 太郎、今井 浩孝、新井 洋由、本間 浩 「NMDA受容体に着目した線虫D-アミノ酸代謝酵素の生理機能の遺伝学的解析」 第11回D-アミノ酸学会学術講演会(新潟、シティーホールプラザアオーレ長岡) 2015.8.25

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 康昭 (SAITOH Yasuaki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00631730